

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001年5月10日 (10.05.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/32220 A1

- (51) 国際特許分類: A61K 48/00, (74) 代理人: 浅村 皓, 外(ASAMURA, Kiyoshi et al.); 〒100-0004 東京都千代田区大手町2丁目2番1号 新大手町ビル331 Tokyo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP00/07502
- (22) 国際出願日: 2000年10月26日 (26.10.2000)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願平 11/309984
1999年10月29日 (29.10.1999) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): メドジーンバイオサイエンス株式会社 (MEDGENE BIOSCIENCE, INC.) [JP/JP]; 〒560-0085 大阪府豊中市上新田1丁目24番C-1101号 Osaka (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 森下竜一 (MORISHITA, Ryuichi) [JP/JP]; 〒532-0003 大阪府大阪市淀川区宮原2-11-22-502 Osaka (JP). 荻原俊男 (OGIHARA, Toshio) [JP/JP]; 〒562-0046 大阪府箕面市桜ヶ丘2-7-29 Osaka (JP).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: GENE THERAPY FOR DIABETIC ISCHEMIC DISEASE

(54) 発明の名称: 糖尿病性虚血性疾患遺伝子治療

(57) Abstract: Administration of an HGF (hepatocyte growth factor) gene to a diabetic ischemic site achieves effect of promoting the angiogenesis of the ischemic site with the depression caused by diabetes and thus causing recovery from an ischemic disease.

(57) 要約:

糖尿病性虚血部位にHGF (肝実質細胞増殖因子) 遺伝子を投与することにより、糖尿病により低下した虚血部位の血管新生の促進を図り、虚血性疾患を回復させるという効果を有する。

WO 01/32220 A1

明 細 書

糖尿病性虚血性疾患遺伝子治療

5 技術分野

本発明は、肝実質細胞増殖因子（HGF）遺伝子を用いた糖尿病性虚血性疾患の治療剤及び治療法に関する。具体的には、HGF遺伝子を有効成分として含有する糖尿病性虚血性疾患治療剤やHGF遺伝子を虚血部位へ投与することを特徴とする糖尿病性虚血性疾患治療法などに関する。

10 背景技術

HGFは、成熟肝細胞に対する強力な増殖促進因子として発見され、その遺伝子クローニングがなされたタンパク質である（Biochem Biophys Res Commun, 122, 1450 (1984)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 6489, (1986)、FEBS

- 15 Letter, 22, 231 (1987)、Nature, 342, 440 (1989)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 3200 (1991))。その後の研究により、HGFはin vivoにおいて肝再生因子として障害肝の修復再生に働くだけでなく、血管新生作用を有し、虚血性疾患や動脈疾患の治療または予防に大きな役割を果たしていることが明らかとなっ
- 20 てきた（Symp. Soc. Exp. Biol., 47 cell behavior, 227-234 (1993)、Proc. Natl. Acad. Sci., 90, 1937-1941 (1993)、Circulation, 97, 381-390 (1998))。すなわち、ウサギの下肢虚血モデルにおいてHGFを投与すると、顕著な血管新生が見られ血
- 25 流量の改善、血圧減少の抑制、虚血症状の改善が生じたとの報告がなされている。これらの報告により、今日では、血管新生因子の一つとしてHGFが発現、機能していると考えられるようになった。

このようにHGFは血管新生因子の機能を始めとして種々の機能を持っており、医薬品として活用するための色々な試みがなされてきた。しかし、ここで問題と

なってきたのがHGFの血中での半減期である。HGFの半減期は約10分と短く、血中濃度を維持することが困難であり、また、HGF有効量の患部への移行性が問題となった。

一般的にタンパク性製剤の場合は静脈内への投与の多いことが常識となっており、前記虚血性疾患モデルに対するHGFの投与に関しても、例えば静脈や動脈内への投与の例が示されている（Circulation, 97, 381-390 (1998)）。このような動物モデルに対する静脈あるいは動脈内投与により、虚血性疾患あるいは動脈疾患に対するHGFの有効性が明らかにされているものの、具体的なHGFの有効な投与方法あるいは投与量等については、未だ結論が出されていない。特にHGFタンパクの場合は、前記のような半減期の問題、患部への移行性の問題もあり、HGFタンパクの有効な投与方法あるいは投与量等については、未だ結論が出されていない。

また一方で、最近の分子生物学の飛躍的向上により、遺伝子導入法による細胞機能の賦活化が可能となり、種々の取り組みがなされており、HGF遺伝子を用いて、心臓領域への遺伝子治療が試みられようとしている。遺伝子の導入法については、例えば冠動脈内拡散注入法等の幾つかの報告があるものの、虚血部位への遺伝子導入法など、特に骨格筋に対する筋肉内導入法を用いて、具体的な糖尿病性虚血性疾患に対して、効果を示した例は見出されていない。

さらに、糖尿病を併発する、または糖尿病性に惹起される虚血性疾患においては血管新生が起こりにくく、予後も不良であることが知られているが、このような糖尿病性虚血性疾患に対してHGF遺伝子の投与が有効であるか否かについては、何ら明らかにされていない。

発明の開示

本発明の目的は、HGF遺伝子を用いた糖尿病性虚血性疾患の治療剤及び治療法を提供することにある。

本発明者らは、HGF遺伝子が糖尿病性の虚血性疾患に適応できるか否かを明らかにするために鋭意検討を行った結果、当該疾患に対して、直接虚血患部にHGF遺伝子を投与することにより、極めて有効な効果が得られることを明らかにした。具体的には下肢虚血性疾患において、下肢骨格筋層にHGF遺伝子を投与

することにより、有効な効果が得られることを見出した。前述のように糖尿病を併発する、または糖尿病性に惹起される虚血性疾患においては血管新生が起こりにくく、予後も不良であることが知られている。そのため単なる虚血性疾患と異なり、糖尿病性虚血性疾患に対してHGF遺伝子が有効であるか否かはこれまで

5 明らかにされていなかったが、本発明により初めてその有効性が示された。

このようなHGF遺伝子による治療は非侵襲的な治療法であるため、病状に応じて何回でも当該遺伝子を投与することが可能であるという特徴を有する。

すなわち本発明の要旨は以下のとおりである。

(1) 肝実質細胞増殖因子(HGF)遺伝子を有効成分として含有する、糖尿病
10 病性虚血性疾患治療剤、

(2) 虚血部位へ投与するための、上記(1)の治療剤、

(3) 糖尿病性虚血性疾患が、糖尿病性下肢虚血性疾患、糖尿病性虚血性神経障害又は糖尿病性心筋梗塞である、上記(1)又は(2)の治療剤、

(4) 糖尿病性虚血性疾患が糖尿病性下肢虚血性疾患である、上記(3)の治
15 療剤、

(5) 虚血部位の筋肉内へ投与するための、上記(1)～(4)のいずれかの治療剤、

(6) HGF遺伝子がセンダイ・ウイルス(HVJ)ーリボソームの形態にある、上記(1)～(5)のいずれかの治療剤、

20 (7) 必要に応じて複数回投与するための、上記(1)～(6)のいずれかの治療剤、

(8) HGF遺伝子として少なくとも50 μ gを用いる、上記(1)～(7)のいずれかの治療剤、

(9) HGF遺伝子をヒトに導入することを含む、糖尿病性虚血性疾患の治療
25 法、

(10) HGF遺伝子を虚血部位へ投与する、上記(9)の治療法、

(11) 糖尿病性虚血性疾患が、糖尿病性下肢虚血性疾患、糖尿病性虚血性神経障害又は糖尿病性心筋梗塞である、上記(9)又は(10)の治療法、

(12) 糖尿病性虚血性疾患が糖尿病性下肢虚血性疾患である、上記(11)

の治療法、

(13) HGF 遺伝子を虚血部位の筋肉内へ投与する、上記(9)～(12)

のいずれかの治療法、

(14) HGF 遺伝子がセンダイ・ウイルス(HVJ)ーリボソームの形態に
5 ある、上記(9)～(13)のいずれかの治療法、

(15) HGF 遺伝子を必要に応じて複数回投与する、上記(9)～(14)

のいずれかの治療法、

(16) HGF 遺伝子として少なくとも50 μ gを投与する、上記(9)～

(15)のいずれかの治療法、

10 (17) 糖尿病性虚血性疾患治療剤の製造のためのHGF 遺伝子の使用、

(18) 糖尿病性虚血性疾患が、糖尿病性下肢虚血性疾患、糖尿病性虚血性神
経障害又は糖尿病性心筋梗塞である、上記(17)の使用、

(19) 糖尿病性虚血性疾患が糖尿病性下肢虚血性疾患である、上記(18)
の使用、

15 (20) HGF 遺伝子がセンダイ・ウイルス(HVJ)ーリボソームの形態に
ある、上記(17)～(19)のいずれかの使用、

(21) HGF 遺伝子として少なくとも50 μ gを用いる、上記(17)～

(20)のいずれかの使用。

図面の簡単な説明

20 図1は、参考例1の糖尿病の下肢虚血ラット群および、正常ラットに下肢虚血
を惹起したコントロール群における、血液還流比率(Perfusion ratio)の経時
的变化を示したグラフである。

図2は、参考例1の糖尿病の下肢虚血ラット群および、正常ラットに下肢虚血
を惹起したコントロール群における虚血筋肉内の内在性HGF濃度を示したグラ

25 フである。

図3は、実施例1の糖尿病の下肢虚血ラットへのHGF 遺伝子投与群および未
投与群と、正常ラットに下肢虚血を惹起したコントロール群における、血液還流
比率を測定した結果を示したグラフである。

図4は、実施例2の糖尿病の下肢虚血ラットへのHGF 遺伝子投与群および未

投与群と、正常ラットに下肢虚血を惹起したコントロール群における、下肢虚血部の骨格筋をALP染色し、単位当たりの血管数を比較した結果を示したグラフである。

図5は、参考例2のグルコースを添加した血管内皮細胞のHGF添加群および未添加群と、グルコースを添加していないコントロール群における、培養上清のMMP-1濃度を測定した結果を示すグラフである。

図6は、参考例3のグルコースを添加した血管内皮細胞のHGF添加群および未添加群と、グルコースを添加していないコントロール群における、血管内皮細胞中に発現する転写因子ETS-1のmRNA量を測定した結果を示すグラフである。

発明の実施するための最良の形態

本発明において使用される「HGF遺伝子」とは、HGF（HGFタンパク）を発現可能な遺伝子を指す。具体的には、Nature, 342, 440(1989)、特許第2777678号公報、Biochem. Biophys. Res. Commun., 163, 967(1989)、Biochem. Biophys. Res. Commun., 172, 321(1990)などに記載のHGFのcDNAを後述の如き適当な発現ベクター（非ウイルスベクター、ウイルスベクター）に組み込んだものが挙げられる。ここでHGFをコードするcDNAの塩基配列は、前記文献に記載されている他、Genbank等のデータベースにも登録されている。従ってこれらの配列情報に基づき適当なDNA部分をPCRのプライマーとして用い、例えば肝臓や白血球由来のmRNAに対してRT-PCR反応を行うことなどにより、HGFのcDNAをクローニングすることができる。これらのクローニングは、例えばMolecular Cloning 2nd Edt., Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)等の基本書に従い、当業者ならば容易に行うことができる。

さらに、本発明のHGF遺伝子は前述のものに限定されず、発現されるタンパク質がHGFと実質的に同じ作用を有する遺伝子である限り、本発明のHGF遺伝子として使用できる。すなわち、1) 前記cDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAや、2) 前記cDNAによりコードされるタンパク質のアミノ酸配列に対して1若しくは複数（好ましくは数個）のアミノ酸が置換、欠失及び／又は付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするD

NA、などのうち、HGFとしての作用を有するタンパクをコードするものであれば、本発明のHGF遺伝子の範疇に含まれる。ここで前記1)及び2)のDNAは、例えば部位特異的突然変異誘発法、PCR法、又は通常のハイブリダイゼーション法などにより容易に得ることができ、具体的には前記Molecular

- 5 Cloning等の基本書を参考にして行うことができる。

次に、本発明の遺伝子治療において用いられる遺伝子導入方法、導入形態および導入量等について記述する。

- 10 HGF遺伝子を有効成分とする遺伝子治療剤を患者に投与する場合、その投与形態としては非ウイルスベクターを用いた場合と、ウイルスベクターを用いた場合の二つに大別され、実験手引書などにその調製法、投与法が詳しく解説されている（別冊実験医学、遺伝子治療の基礎技術、羊土社、1996、別冊実験医学、遺伝子導入&発現解析実験法、羊土社、1997、日本遺伝子治療学会編遺伝子治療開発研究ハンドブック、エヌ・ティー・エス、1999）。以下、具体的に説明する。

A. 非ウイルスベクターを用いる場合

- 15 慣用の遺伝子発現ベクターに目的とする遺伝子が組み込まれた組換え発現ベクターを用いて、以下のような手法により目的遺伝子を細胞や組織に導入することができる。

細胞への遺伝子導入法としては、リポフェクション法、リン酸-カルシウム共沈法、DEAE-デキストラン法、微小ガラス管を用いたDNAの直接注入法な

- 20 どが挙げられる。

- また、組織への遺伝子導入法としては、内包型リポソーム (internal type liposome) による遺伝子導入法、静電気型リポソーム (electrostatic type liposome) による遺伝子導入法、HVJ-リポソーム法、改良型HVJ-リポソーム法 (HVJ-AVEリポソーム法)、レセプター介在性遺伝子導入法、パーティクル銃で担体 (金属粒子) とともにDNA分子を細胞に移入する方法、naked-DNAの直接導入法、正電荷ポリマーによる導入法等のいずれかの方法に供することにより、組換え発現ベクターを細胞内に取り込ませることが可能である。

このうちHVJ-リポソームは、脂質二重膜で作られたリポソーム中にDNAを封入し、さらにこのリポソームと不活化したセンダイウイルス

(Hemagglutinating virus of Japan : H V J) とを融合させたものである。当該 H V J - リボソーム法は従来のリボソーム法と比較して、細胞膜との融合活性が非常に高いことを特徴とするものであり、好ましい導入形態である。H V J - リボソームの調製法については文献（実験医学別冊, 遺伝子治療の基礎技術, 羊土社, 1996、遺伝子導入&発現解析実験法, 羊土社, 1997、J. Clin. Invest. 93, 1458-1464(1994)、Am. J. Physiol. 271, R1212-1220(1996)）などに詳しく述べられているため、それらを参照されたい。また H V J リボソーム法とは、例えば Molecular Medicine, 30, 1440-1448(1993)、実験医学, 12, 1822-1826(1994)、蛋白質・核酸・酵素, 42, 1806-1813(1997) 等に記載の方法であり、好ましくは
5
10 Circulation, 92(Suppl. II), 479-482(1995)に記載の方法が挙げられる。

なお H V J としては Z 株 (ATCC より入手可能) が好ましいが、基本的には他の H V J 株 (例えば ATCC VR-907 や ATCC VR-105 など) も用いることができる。

さらに、n a k e d - D N A の直接導入法は、上記手法のうち最も簡便な手法であり、この観点から好ましい導入法である。

15 ここで用いられる発現ベクターとしては、生体内で目的遺伝子を発現させることのできるベクターであれば如何なる発現ベクターであっても良いが、例えば p C A G G S (Gene 108, 193-200(1991)) や、p B K - C M V、p c D N A 3. 1、p Z e o S V (インビトロゲン社、ストラタジーン社) などの発現ベクターが挙げられる。

20 B. ウイルスベクターを用いる場合

ウイルスベクターとしては、組換えアデノウイルス、レトロウイルス等のウイルスベクターを用いた方法が代表的なものである。より具体的には、例えば、無毒化したレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス、ポリオウイルス、シンビスウイルス、センダイウイルス、S V 4 0、免疫不全症ウイルス (H I V) 等の D N A
25 ウイルスまたは R N A ウイルスに目的とする遺伝子を導入し、細胞に組換えウイルスを感染させることによって、細胞内に遺伝子を導入することが可能である。

前記ウイルスベクターのうち、アデノウイルスの感染効率が他のウイルスベクターを用いた場合よりもはるかに高いことが知られており、この観点からは、ア

デノウイルスベクター系を用いることが好ましい。

本発明の遺伝子治療剤の患者への導入法としては、遺伝子治療剤を直接体内に導入する *in vivo* 法、及び、ヒトからある種の細胞を取り出して体外で遺伝子治療剤を該細胞に導入し、その細胞を体内に戻す *ex vivo* 法がある

- 5 (日経サイエンス、1994年4月号、20-45頁、月刊薬事、36(1)、23-48(1994)、実験医学増刊、12(15)、(1994)、日本遺伝子治療学会編 遺伝子治療開発研究ハンドブック、エヌ・ティー・エス、1999)。本発明では、*in vivo* 法が好ましい。

- 10 製剤形態としては、上記の各投与形態に合った種々の製剤形態(例えば液剤など)をとり得る。例えば有効成分である遺伝子を含む注射剤とされた場合、当該注射剤は常法により調製することができ、例えば適切な溶剤(PBS等の緩衝液、生理食塩水、滅菌水等)に溶解した後、必要に応じてフィルター等で濾過滅菌し、次いで無菌的な容器に充填することにより調製することができる。当該注射剤には必要に応じて慣用の担体等を加えても良い。また、HVJ-リポソーム等のリポソームにおいては、懸濁剤、凍結剤、遠心分離濃縮凍結剤などのリポ
- 15 ソーム製剤の形態とすることができる。

- 本発明で用いられるHGF遺伝子以外に、血管新生作用を有する公知の因子を併用して、又は単独で用いることが可能である。例えば、VEGFやFGF等の因子は血管新生作用を有することが報告されており、これらの遺伝子を使用す
- 20 ことが出来る。またEGF等の増殖因子は、組織の種々の細胞障害を修復することが報告されており、これらの遺伝子を用いることも可能である。

- 本発明でいう糖尿病性虚血性疾患とは、糖尿病性下肢虚血性疾患、糖尿病性虚血性神経障害または、糖尿病性心筋梗塞などであり、これらのいずれの疾患に対しても本発明の遺伝子治療剤を適用することができる。また本発明の遺伝子治療
- 25 剤は、重症の糖尿病性虚血性疾患の患者だけでなく、進行中の軽度の患者にも使用することができる。

本発明の遺伝子治療剤は、治療目的の疾患、症状などに応じた適当な投与方法・投与部位が選択される。投与方法としては、非経口的に投与することが好ましい。また投与部位としては、虚血部位内に投与することが好ましい。ここで「虚

血部位」とは、虚血患部及びその周辺を含む部位を指す。

虚血部位においては、具体的には血管内や筋肉内などへの投与が可能であるが、特に、虚血部位の筋肉内に投与することが好ましい。すなわち下肢虚血性疾患においては、下肢虚血部位の骨格筋内に投与することにより、虚血患部の血管新生を促進させ血流量の改善を図り、虚血患部の機能の回復正常化を行うことが出来る。また心筋梗塞等の心疾患においては、心筋内に投与することにより、同様の効果を上げることができる。

好ましい投与方法としては、例えば、非侵襲的なカテーテルあるいは非侵襲的な注射器等による投与方法を挙げることができる。更に、エコー使用下での非侵襲的なカテーテルあるいは注射器等による投与方法を挙げることができる。非侵襲的なカテーテルを用いる投与方法としては、例えば、心疾患においては、心室内腔より心筋内に直接HGF遺伝子を注入する方法が挙げられる。

本発明のHGF遺伝子を適用することにより、糖尿病性の虚血性疾患の患者に対して積極的な遺伝子導入による治療を行うことができ、例えば、糖尿病性下肢虚血性疾患の患者においては、従来であれば外科的な患部の切除以外には道のない重症の患者に対して、機能の回復が可能となる。

本発明の治療剤の投与量としては、患者の症状等によって異なるが、成人患者1人当たりHGF遺伝子として約1 μ g～約50mgの範囲、好ましくは約10 μ g～約5mg、より好ましくは約50 μ g～約5mgの範囲から投与量が選択される。

本発明の治療剤は、数日ないし数週間に一回投与するのが好適であり、投与回数は適宜患者の症状に応じて選択される。本発明の治療剤は、非侵襲的な投与に供されるものであるため、病状に応じて何回でも投与できるという特徴を有する。

以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によりなんら限定されるものではない。

実験材料及び方法

HVJリポソーム製剤の作製

10mgの乾燥脂質（ホスファチジルセリン、ホスファチジルコリン、コレステロールの1:4.8:2の混合物）と、HGF遺伝子（100 μ g）－HMG1（high

- mobility group 1 nuclear protein, 25 μ g) を含有する等張液 (137 μ M NaCl, 5.4 μ M KCl, 10 μ M Tris-HCl; pH7.6) 200 μ l を混合し、激しく攪拌して超音波を掛けてリボソームを形成させた。精製センダイウイルス (Z株) を3分間UV照射 (110erg/mm²/sec) した。リボソーム懸濁液とセンダイウイルス (HV J) を混合して4℃10分間、続いて37℃30分間加温した。遊離のHV Jを除去して、HV Jリボソーム製剤を取得した。

実験動物

投与群：糖尿病ラット (DM-ラット) の下肢虚血ラット

コントロール・ラット：正常ラットの下肢虚血ラット

10 HV Jリボソーム製剤の投与方法

腹腔内にストレプトゾトシンを投与することにより誘発した16週齢の糖尿病ラット (1群6匹) に対して、片側大腿動脈の一部外科的切除を行って、下肢部に虚血状態を作製した。

HGF遺伝子含有HV J-リボソーム製剤を、下肢虚血骨格筋に注入した。

15 検討内容

リボソーム製剤投与後、側副血行路形成および血流改善効果の指標としてレーザー散乱光解析によるレーザー・ドップラー・イメージャー (LDI) を用いて下肢血流を測定した。正常下肢に対する虚血下肢の色調ヒストグラム (colored histogram) の平均値を血液還流比率 (perfusion ratio) とした。

- 20 下肢虚血部分の毛細血管密度をアルカリフォスファターゼ (ALP) 染色により測定し、糖尿病下肢虚血ラット群とコントロールの下肢虚血ラット群とで比較した。あるいは、HGF遺伝子の投与群と未投与群とで比較した。

参考例1

糖尿病ラットの下肢虚血部位におけるHGF発現状況

- 25 腹腔内にストレプトゾトシンを投与して誘発した16週齢の糖尿病ラット (1群6匹) およびコントロール群として16週齢の正常のラット (1群6匹) に対して、片側大腿動脈の一部外科的切除を行って、下肢部に虚血状態をもたらした。

1週間後、レーザー・ドップラー・イメージャーにより虚血部位の血液還流比率を測定した。糖尿病下肢虚血ラットの下肢虚血部位の血液還流比率は、コントロー

ルの下肢虚血ラットの血液還流比率よりもはるかに低いものであった（図1参照）。

3週間後、5週間後にも、虚血部位の血液還流比率を測定したところ、同様に糖尿病下肢虚血ラットの虚血部位の血液還流比率は、コントロールの下肢虚血ラットの血液還流比率よりもはるかに低いものであった（図1参照）。

筋肉内の内在性HGFの濃度は、糖尿病下肢虚血ラットの虚血部位の筋肉内においてコントロールの下肢虚血ラットの筋肉内よりも顕著に低いものであった。この結果は、糖尿病において血管新生が不良である原因が筋肉内の内在性HGFの減少によるものであることを示している。このため、糖尿病下肢虚血ラットでは、血管新生が起こりにくくなり、側副血行路が発達しないと考えられる（図2参照）。

実施例1

糖尿病下肢虚血ラットに対するHGF遺伝子治療の効果（I）

腹腔内にストレプトゾトシンを投与することにより誘発した16週齢の糖尿病ラット（1群6匹）および16週齢の正常ラット（1群6匹）に対して、片側大腿動脈の一部の外科的切除を行って、下肢部に虚血状態をもたらした。大腿動脈の外科的切除後、HGF遺伝子（50 μ g）含有HVJ-リボソーム製剤を下肢虚血部位の筋肉内に導入した。

3週間後、レーザー・ドップラー・イメージャーにより虚血部位の血液還流比率を測定した。HGF遺伝子が投与された糖尿病下肢虚血ラットの虚血部位の血液還流比率は、コントロールの下肢虚血ラットや未投与の上記糖尿病下肢虚血ラットと比較し、顕著な増加を示した。

コントロールの下肢虚血ラットの血液還流比率を100%とすると、HGF遺伝子未投与の糖尿病下肢虚血ラットでは67%であり、HGF遺伝子を投与した糖尿病下肢虚血ラットでは129%であった。結果を図3に示す（図1参照）。

実施例2

糖尿病下肢虚血ラットに対するHGF遺伝子治療の効果（II）

上記と同じ様に処置をした糖尿病下肢虚血ラット、コントロールの下肢虚血ラットを作製し、HGF遺伝子治療を行った。5週間後に各ラットの下肢虚血部位

の骨格筋を取り出し、ALP染色し単位面積当たりの血管数を比較した。HGF遺伝子未投与の糖尿病下肢虚血ラットでは、コントロールの下肢虚血ラットと比較して有意に血管数が少なく、HGF遺伝子投与の糖尿病下肢虚血ラットは血管数が有意に増加していた。結果を図4に示す。

5 参考例2

血管内皮細胞によるMMP-1の産生に対するグルコース濃度およびHGF添加の影響

血管内皮細胞（ヒト大動脈由来）を無血清下で、グルコース濃度が0、25 mM、50 mMとなるような3種の培地で培養し、24時間培養後の培養液上清
10 のMMP-1濃度を測定した。

また各々、グルコース添付の30分前にHGFを100 ng/mlで添加した場合と比較した。

上清中のMMP-1濃度が、グルコースの濃度依存的に有意に減少し、HGF処理によりMMP-1の減少が止まり増加することが示された。結果を図5に示
15 す。

参考例3

血管内皮細胞に対するHGFの効果（血管新生に係わる転写因子ETS-1の変化）

参考例1と同様に血管内皮細胞を培養し、細胞中に発現する転写因子ETS-
20 1のmRNA量を測定した。コントロールの内皮細胞の、ETS-1のmRNA量を100%とすると、HGF未添加の血管内皮細胞では高グルコースの条件により有意に減少していた。一方、HGF添加の血管内皮細胞ではコントロールの発現量と比較して同等以上になっていた（ $P < 0.01$ ）。結果を図6に示す。

以上のように、高グルコース条件下の血管内皮細胞では、血管新生のために必
25 須のマトリックス分解酵素であるMMP-1の産生が減少し、血管新生時に発現、増加する転写因子であるETS-1のmRNA発現が低下していた。

上記のことから、高グルコース条件下では血管新生がおこりにくくなっていることが明らかにされた。一方、高グルコース条件下の血管内皮細胞にHGFを添加することにより、MMP-1の産生、ETS-1のmRNAの発現が顕著に増

加し、HGFにより血管新生がおこりやすくなっていることが示された。

産業上の利用可能性

- 本発明のHGF遺伝子を有効成分とする糖尿病性虚血性疾患治療剤は、HGFの発現の減少した糖尿病性虚血患部に特有の血管新生不良を改善し、顕著な血管
- 5 新生作用を示すことから、虚血患部の血流量を増大させ病状を改善することができる。しかも、本発明の治療剤は患者の病状に応じて1回以上の投与を行うことにより、その目的である血管新生を促進することができる。従ってこれらの効果により、本発明の治療剤は糖尿病性下肢虚血性疾患、糖尿病性虚血性神経障害または、糖尿病性心筋梗塞をよりの確に治療することができる。

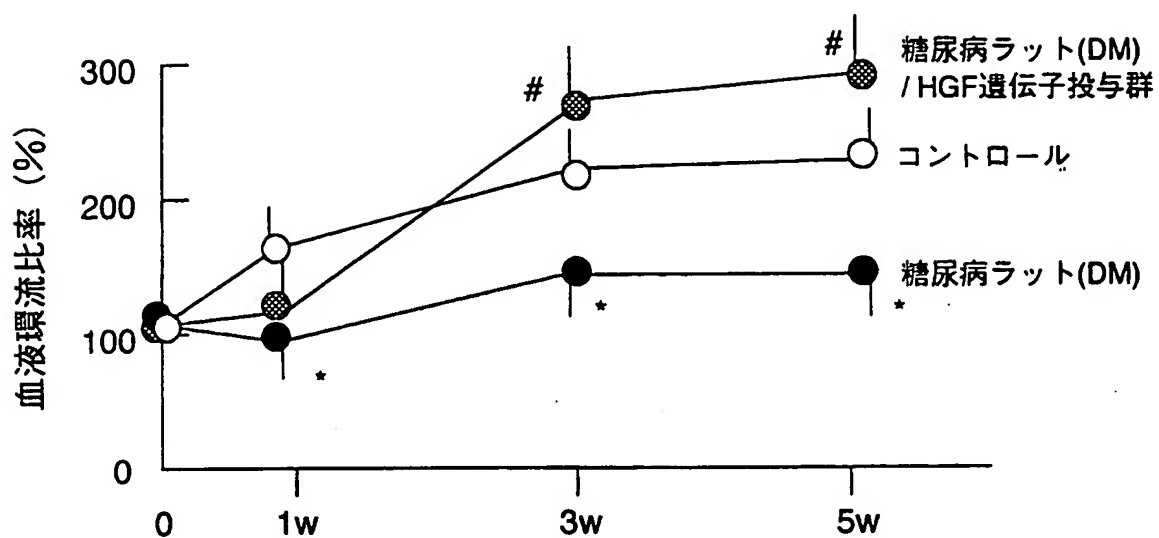
請 求 の 範 囲

1. 肝実質細胞増殖因子（HGF）遺伝子を有効成分として含有する、糖尿病性虚血性疾患治療剤。
- 5 2. 虚血部位へ投与するための、請求項1記載の治療剤。
 3. 糖尿病性虚血性疾患が、糖尿病性下肢虚血性疾患、糖尿病性虚血性神経障害又は糖尿病性心筋梗塞である、請求項1又は2記載の治療剤。
 4. 糖尿病性虚血性疾患が糖尿病性下肢虚血性疾患である、請求項3記載の治療剤。
- 10 5. 虚血部位の筋肉内へ投与するための、請求項1～4のいずれか記載の治療剤。
 6. HGF遺伝子がセンダイ・ウイルス（HVJ）ーリボソームの形態にある、請求項1～5のいずれか記載の治療剤。
 7. 必要に応じて複数回投与するための、請求項1～6のいずれか記載の治療剤。
- 15 8. HGF遺伝子として少なくとも50 μ gを用いる、請求項1～7のいずれか記載の治療剤。
 9. HGF遺伝子をヒトに導入することを含む、糖尿病性虚血性疾患の治療法。
 10. HGF遺伝子を虚血部位へ投与する、請求項9記載の治療法。
- 20 11. 糖尿病性虚血性疾患が、糖尿病性下肢虚血性疾患、糖尿病性虚血性神経障害又は糖尿病性心筋梗塞である、請求項9又は10記載の治療法。
 12. 糖尿病性虚血性疾患が糖尿病性下肢虚血性疾患である、請求項11記載の治療法。
 13. HGF遺伝子を虚血部位の筋肉内へ投与する、請求項9～12のいずれか記載の治療法。
- 25 14. HGF遺伝子がセンダイ・ウイルス（HVJ）ーリボソームの形態にある、請求項9～13のいずれか記載の治療法。
 15. HGF遺伝子を必要に応じて複数回投与する、請求項9～14のいずれか記載の治療法。

16. HGF遺伝子として少なくとも50 μ gを投与する、請求項9～15のいずれか記載の治療法。
17. 糖尿病性虚血性疾患治療剤の製造のためのHGF遺伝子の使用。
18. 糖尿病性虚血性疾患が、糖尿病性下肢虚血性疾患、糖尿病性虚血性神経
- 5 障害又は糖尿病性心筋梗塞である、請求項17記載の使用。
19. 糖尿病性虚血性疾患が糖尿病性下肢虚血性疾患である、請求項18記載の使用。
20. HGF遺伝子がセンダイ・ウイルス（HVJ）ーリポソームの形態にある、請求項17～19のいずれか記載の使用。
- 10 21. HGF遺伝子として少なくとも50 μ gを用いる、請求項17～20のいずれか記載の使用。

1/3

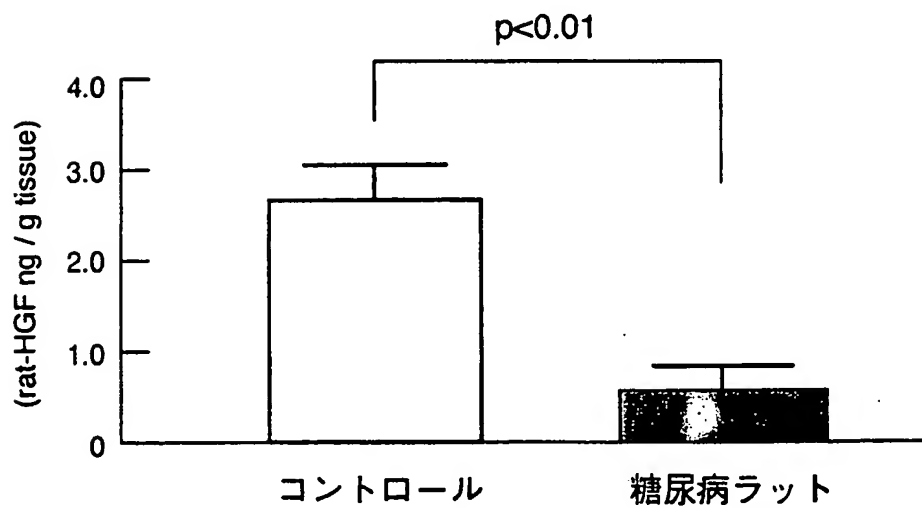
FIG. 1



*; p<0.05 v.s. Control

#; p<0.05 v.s. DM

FIG. 2



2/3

FIG. 3

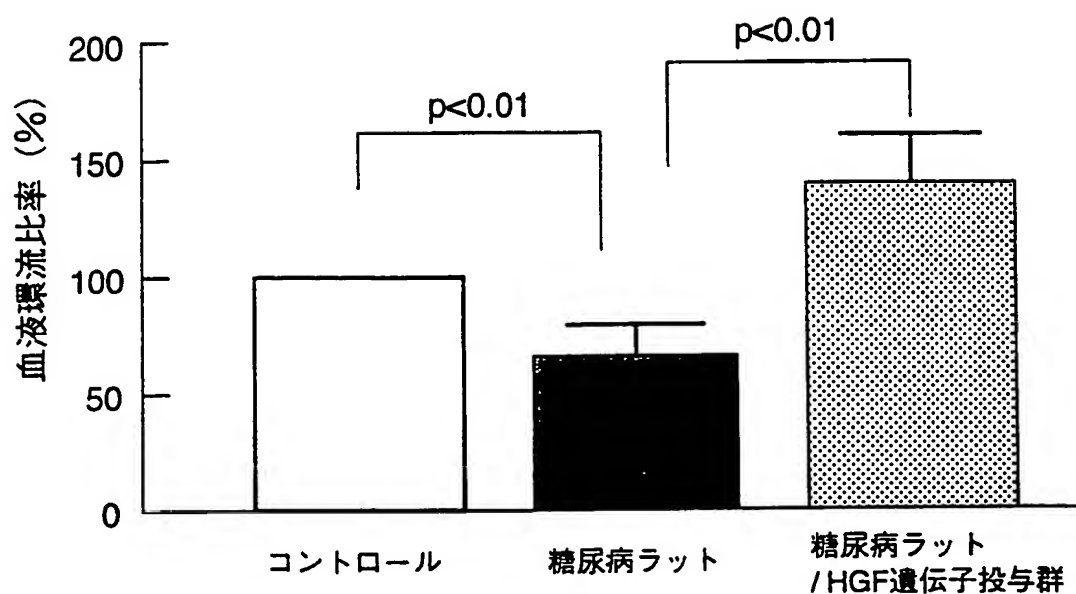
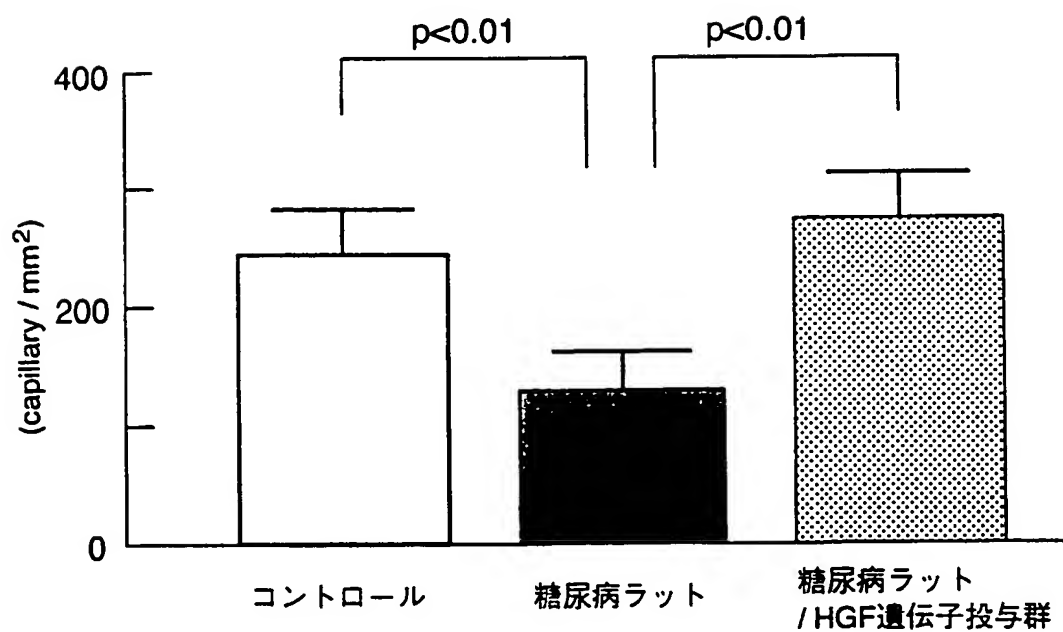


FIG. 4



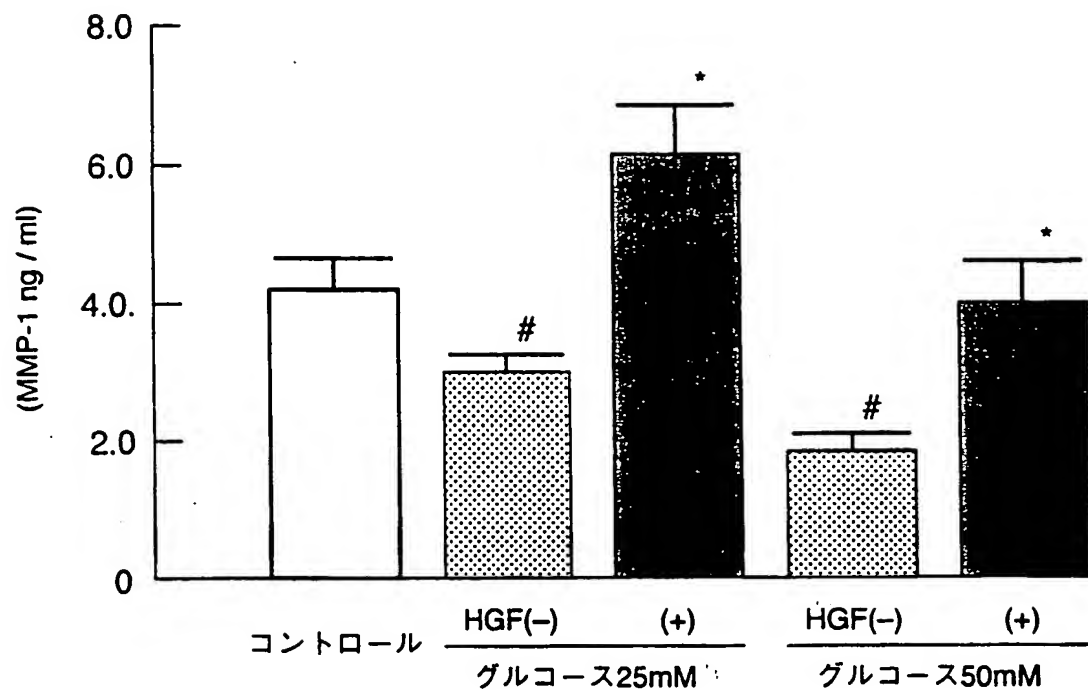
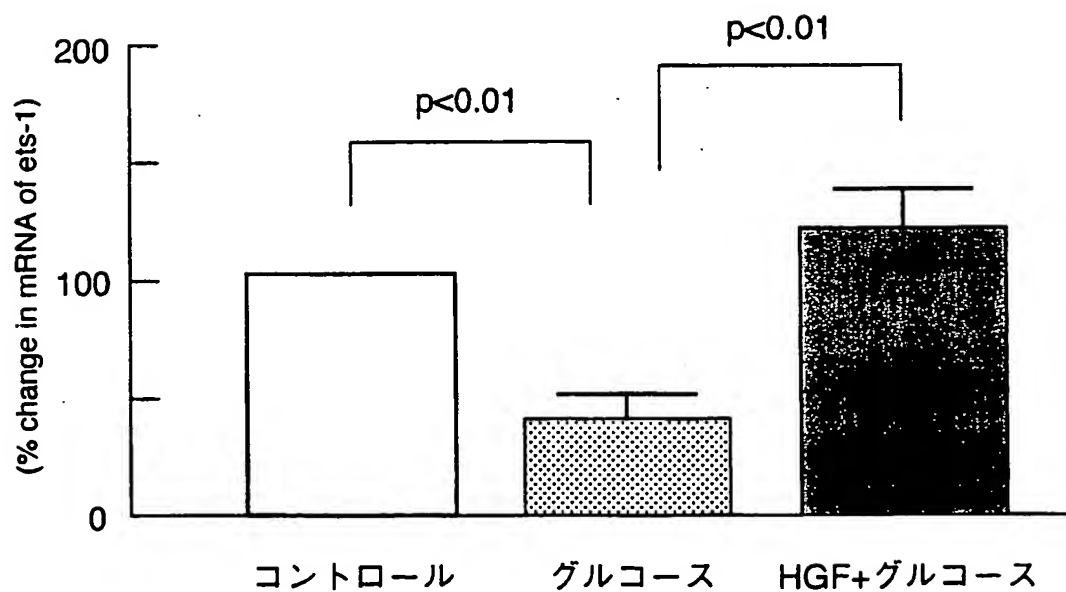
3/3
FIG. 5

FIG. 6



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/07502

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K48/00, 38/22, 9/127, A61P9/10, 3/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K48/00, 38/22, 9/127, A61P9/10, 3/10

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), CA (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ERIC Van Belle et al., "Potentiated Angiogenic Effect of Scatter Factor/Hepatocyte Growth Factor via Induction of Vascular Endothelial Growth Factor", Circulation, (1998) Vol.97, pp.381-390	1-8,17-21
X	DERRICK S.G. et al., "Scatter factor induces blood vessel formation in vivo", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1993) Vol.90, pp.1937-1941	1-8,17-21
X	AOKI, Motokuni et al., "Beneficial angiogenesis induced by over-expression of human hepatocyte growth factor (HGF) in non-infarcted and infarcted myocardium: Potential gene therapy for myocardial infarction", Circulation, (1998) Vol. 98, No. 17, pp.1321	1-8,17-21
X	UEDA, Hideki et al., "In vivo gene transfection of hepatocyte growth factor attenuates ischemia-reperfusion injury in the heart: Evidence for a role of HGF in endogenous myocardial protection", Circulation, (1997) Vol. 96, No. 8, p. 1619	1-8,17-21

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
22 December, 2000 (22.12.00)Date of mailing of the international search report
16 January, 2001 (16.01.01)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/07502

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO, 97/14307, A1 (ST. ELIZABETH'S MEDICAL CENTER OF BOSTON, INC.), 24 April, 1997 (24.04.97) & JP, 11-514366, A & US, 6121246, A & EP, 883343, A1 & AU, 9674548, A	1-8, 17-21
X	WO, 99/36103, A1 (MCGILL UNIVERSITY), 22 July, 1999 (22.07.99) (Family: none)	1-3, 5-8, 17, 18, 20, 21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/07502

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 9-16
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 9 to 16 pertain to methods for treatment of the human body by surgery or therapy, as well as diagnostic methods, and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required to search.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁷ A61K48/00, 38/22, 9/127, A61P9/10, 3/10		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁷ A61K48/00, 38/22, 9/127, A61P9/10, 3/10		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), CA (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	ERIC Van Belle et al., "Potentiated Angiogenic Effect of Scatter Factor/Hepatocyte Growth Factor via Induction of Vascular Endothelial Growth Factor", Circulation, (1998) Vol. 97, p. 381-390	1-8, 17-21
X	DERRICK S.G. et al., "Scatter factor induces blood vessel formation in vivo", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1993) Vol. 90, p. 1937-1941	1-8, 17-21
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日	
22. 12. 00	16.01.01	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 榎本 佳子 印	4 P 9638
	電話番号 03-3581-1101	内線 3492

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	AOKI, Motokuni et al., "Beneficial angiogenesis induced by over-expression of human hepatocyte growth factor (HGF) in non-infarcted and infarcted myocardium: Potential gene therapy for myocardial infarction", Circulation, (1998) Vol. 98, No. 17, p. I321	1-8, 17-21
X	UEDA, Hideki et al., "In vivo gene transfection of hepatocyte growth factor attenuates ischemia-reperfusion injury in the heart: Evidence for a role of HGF in endogenous myocardial protection", Circulation, (1997) Vol. 96, No. 8, p. I619	1-8, 17-21
X	WO, 97/14307, A1 (ST. ELIZABETH'S MEDICAL CENTER OF BOSTON, INC.) 24. 4月. 1997 (24. 04. 97) &JP, 11-514366, A &US, 6121246, A &EP, 883343, A1 &AU, 9674548, A	1-8, 17-21
X	WO, 99/36103, A1 (MCGILL UNIVERSITY) 22. 7月. 1999 (22. 07. 99) (ファミリーなし)	1-3, 5-8, 17, 18, 20, 21

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 9-16 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求の範囲 9-16 は手術又は治療による人体の手術又は治療による処置方法及び診断方法であり、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であって PCT 規則 6.4(a) の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

DESCRIPTION

GENE THERAPY FOR DIABETIC ISCHEMIC DISEASE

5 Technical Field

The present invention relates to a gene therapy agent and gene therapy method for diabetic ischemic disease utilizing a hepatocyte growth factor (HGF) gene. More specifically, the present invention relates to a method of gene therapy for diabetic ischemic disease which comprises
10 the noninvasive administration of therapeutic agents of diabetic ischemic disease comprising an HGF gene as the effective ingredient or HGF gene.

Background Art

HGF is a protein that was first discovered as a strong growth factor
15 for mature hepatocytes and the gene encoding it has been cloned (Biochem. Biophys. Res. Commun. 122, 1450 (1984); Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 6489 (1986); FEBS Letter 22, 231 (1987); Nature 342, 440 (1989); Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 3200 (1991)). Afterwards, according to researches, it has been revealed that HGF does not only work for repair
20 and regeneration of the damaged liver, as a hepatocyte regeneration factor *in vivo*, but also has an angiogenic function and plays an important role in treatment and prevention of ischemic disease and artery disease (Symp. Soc. Exp. Biol. 47 cell behavior, 227-234 (1993); Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 1937-1941 (1993); Circulation 97, 381-390
25 (1998)). That is, it has been reported that upon administration of HGF to the rabbit lower limb ischemic model, significant angiogenesis is observed and improvement in blood flow, repression of blood pressure decrease and improvement in ischemic symptoms take place. According to these reports, it is believed today that HGF expresses and functions
30 as one of the angiogenic factors.

As stated above, HGF has various functions to begin with functions as angiogenic factor, and many attempts have been made to use it as a drug. However, the half life of HGF in blood arose as a problem. The

half life of HGF is as short as about 10 minutes, making it difficult to maintain its concentration in blood. Thus, problems arose as to how to deliver effective levels of HGF to the affected site.

Generally it is common knowledge that protein preparations are mostly administered intravenously and concerning the case above of HGF administration for the ischemic disease model, examples of intravenous and intra-arterial administration are shown (Circulation 97, 381-390 (1998)). In spite of the fact that effectiveness against ischemic disease or artery disease of intravenous or intra-arterial HGF administration to such animal models are revealed, specific administration methods, doses and so on effective for HGF are still under investigation. Particular effective administration methods or doses and such for HGF proteins are still to be determined, due to problems concerning its half life and delivery to the affected site described above.

On the other hand, the rapid progress lately in molecular biology has made it possible to activate cellular function by gene transfer methods and various attempts have been made. Some trials have been made for gene therapy of the heart region. There are some methods, like the coronary diffusional infusion method and such, reported for gene transfer methods but there is no case of gene transfer methods to the ischemic site, particularly intramuscular infusion method to the skeletal muscle showing effects on specific diabetic ischemic disease.

Further, it is known that angiogenesis hardly occurs and prognosis is unfavorable in ischemic disease complicated with or caused by diabetes. At present, it is not known whether HGF gene administration to such diabetic ischemic disease is effective or not.

Disclosure of the Invention

The object of this invention is to provide therapeutic agents and treatment methods for diabetic ischemic disease that utilize the HGF gene.

Inventors investigated to find out whether the HGF gene can be

adapted to diabetic ischemic disease and revealed that extremely effective results are obtained by administering HGF gene directly to the ischemic affected site. Specifically, relating to lower limb ischemic disease, it was found out that effective results are obtained by administering HGF gene to the lower limb layer. As mentioned above, it is known that angiogenesis hardly occurs and prognosis is unfavorable in ischemic disease complicated with or caused by diabetes. Therefore, unlike mere ischemic disease, it had been unknown whether the HGF gene is effective toward diabetic ischemic disease. This invention revealed the effectiveness of the HGF gene for diabetic ischemic disease for the first time.

Since this method is a noninvasive treatment, it has the advantage that it is possible to administer the present gene repeatedly according to the condition.

Thus, the outline of the present invention is as follows:

- (1) a therapeutic agent for diabetic ischemic disease, which comprises hepatocyte growth factor (HGF) as the effective ingredient;
- (2) the therapeutic agent according to (1), used for administration to the ischemic site;
- (3) the therapeutic agent according to (1) or (2), wherein the diabetic ischemic disease is selected from the group consisting of diabetic lower limb ischemic disease, diabetic ischemic neuropathy or diabetic ischemic myocardial infarction;
- (4) the therapeutic agent according to (3), wherein the diabetic ischemic disease is diabetic lower limb ischemic disease;
- (5) the therapeutic agent according to any of (1) to (4), used for administration into the muscle of the ischemic site;
- (6) the therapeutic agent according to any of (1) to (5), wherein the HGF gene is in the form of a Sendai virus (HVJ)-liposome;
- (7) the therapeutic agent according to any of (1) to (6), which is to be administered repeatedly as needed;
- (8) the therapeutic agent according to any of (1) to (7), wherein the amount of HGF gene used is at least 50 μ g;

- (9) a method for the treatment of diabetic ischemic disease, which comprises the transfer of the HGF gene into human;
- (10) the method according to (9), wherein the HGF gene is administered to an ischemic site;
- 5 (11) the method according to (9) or (10), wherein the diabetic ischemic disease is selected from the group consisting of diabetic lower limb ischemic disease, diabetic ischemic neuropathy or diabetic ischemic myocardial infarction;
- (12) the method according to (11), wherein the diabetic ischemic disease
- 10 is diabetic lower limb ischemic disease;
- (13) the method according to any of (9) to (12), wherein the HGF gene is administered into the muscle of ischemic site;
- (14) the method according to any of (9) to (13), wherein the HGF gene is in the form of a Sendai virus (HVJ)-liposome;
- 15 (15) the method according to any of (9) to (14), wherein the HGF gene is administered repeatedly as needed;
- (16) the method according to any of (9) to (15), wherein the amount of HGF gene to be administered is at least 50 μ g;
- (17) use of the HGF gene for preparing therapeutic agents for diabetic
- 20 ischemic disease;
- (18) the use according to (17), wherein the diabetic ischemic disease is selected from the group consisting of diabetic lower limb ischemic disease, diabetic ischemic neuropathy or diabetic ischemic myocardial infarction;
- 25 (19) the use according to (18), wherein the diabetic ischemic disease is diabetic lower limb ischemic disease;
- (20) the use according to any of (17) to (19), wherein the HGF gene is in the form of a Sendai virus (HVJ)-liposome; and
- (21) the use according to any of (17) to (20), wherein the amount of
- 30 HGF gene to be used is at least 50 μ g.

Brief Description of the Drawings

Figure 1 is a graph showing changes in blood perfusion ratio over

time of the group of rats with diabetic lower limb ischemia in reference 1 and of the control group, in which lower limb ischemia was induced in normal rats.

Figure 2 is a graph showing the internal HGF concentration in ischemic muscle of the group of rats with diabetic lower limb ischemia in reference 1 and of the control group, in which lower limb ischemia was induced in normal rats.

Figure 3 shows the the blood perfusion ratio of the group of rats with diabetic lower limb ischemia in reference 1, to which HGF gene was administered or not, and of the control group, in which lower limb ischemia was induced in normal rats.

Figure 4 is a graph showing the result of a comparison of the number of blood vessels of the group of rats with diabetic lower limb ischemia in reference 1, to which HGF gene was administered or not, and of the control group, in which lower limb ischemia was induced in normal rats by ALP (alkalinephosphatase) staining of the skeletal muscle of the lower limb ischemic site.

Figure 5 is a graph showing the MMP-1 concentration in the culture supernatant of the glucose added angioendothelial cell in reference 2, to which HGF was added or not, and of the control group, to which no glucose was added.

Figure 6 is a graph showing the amount of mRNA of transcription factor which is expressed in the angioendothelial cell, of the group of glucose added angioendothelial cell in reference 3, to which HGF was added or not, and of the control group to which no glucose was added.

Best Mode for Carrying out the Invention

As used herein "HGF gene" means a gene that can express HGF (the HGF protein). Specifically, cDNA of HGF described in Nature 342: 440 (1989); Japanese Patent Publication No., 2777678; Biochem.Biophys.Res.Comm. 163: 967 (1989); and Biochem.Biophys.Res.Comm. 172: 321 (1990) and so on integrated into suitable expression vectors (non-viral vector, viral vector) described

below are to be mentioned. The base sequence of the cDNA encoding HGF gene of the present invention has been described in the above literature and is also registered with databases such as GenBank. Thus, based on such sequence information, using a suitable DNA portion as a PCR primer, it is possible to clone the cDNA of HGF, for example, by performing a RT-PCR reaction on mRNA derived from the liver or leukocytes. Such cloning can easily be performed by a person skilled in the art according to a basic textbook, such as Molecular Cloning 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989).

The HGF genes of the present invention are not restricted to the above mentioned genes but also include those genes that express proteins with substantially the same function as HGF. That is, the following genes fall under the category of the HGF gene of the present invention: 1) DNA that hybridize to said cDNA under stringent conditions, and 2) DNA encoding proteins having amino acid sequence in which 1 or more (preferably a few) amino acids are substituted, deleted and/or added to the protein encoded by said cDNA and which encodes proteins having the function as HGF. Above DNAs of 1) and 2) can be readily obtained, for example, by site-directed mutagenesis, PCR method, ordinal hybridization method and so on. Such methods can be easily accomplished according to the above basic textbook.

Subsequently, methods of gene transfer, dosage forms, doses and the like for use in gene therapy of the present invention are explained.

The dosage form of a gene therapy agent comprising the above gene as the effective ingredient to be administered to patients are roughly classified into two groups: one is the case in which a nonviral vector is used, and the other is in which a viral vector is used. Methods for preparation and administration thereof are explained in detail in experimental manuals (Supplement of Experimental Medicine, Basic Technology in gene therapy, Yodosha (1996); Supplement of Experimental Medicine, Experimental Methods in Gene Introduction and Expression Analysis, Yodosha (1997); Handbook for Development and Research of Gene Therapy, Japan Society of Gene Therapy ed., NTS (1999)). Specifics

are explained below.

A. Usage of a nonviral vector

Using a recombinant expression vector in which the gene of interest has been integrated into a commonly used gene expression vector, may
5 be used to introduce the gene of interest into cells or tissue by the following method etc.

Illustrative methods of gene transfer into cells include the lipofection method, calcium phosphate co-precipitation method, DEAE-dextran method, direct DNA introduction methods using micro glass
10 tubes, and the like.

Regarding methods of gene transfer into the tissue, a recombinant expression vector may be incorporated into the cell by subjecting it to any of the method, such as the method of gene transfer with internal type liposome, method of gene introduction with electrostatic type
15 liposome, HVJ-liposome method, improved HVJ-liposome method (HVJ-AVE liposome method), receptor-mediated gene introduction method, method of introducing DNA molecules together with carriers (metal particles) by a particle gun, method of directly introducing naked-DNA, method of introduction with positively-charged polymers and the like.

20 Among them, HVJ-liposome is a fusion product prepared by enclosing DNA into liposome made of lipid bilayer, which is fused to inactivated Sendai virus (Hemagglutinating virus of Japan: HVJ). The HVJ-liposome method is characterized by a very high fusing activity with the cell membrane as compared to the conventional liposome method, and is a
25 preferred mode of introduction. For the method of preparing HVJ-liposome, see the literature for details (Separate volume of Experimental Medicine, Basic Technology in gene therapy, Yodosha (1996); experimental Methods in Gene Introduction and Expression Analysis, Yodosha (1997); J.Clin.Invest. 93:1458-1464(1994); Am.J.Physiol. 271:R1212-1220(1996)) and the like, and experimental examples described
30 below for details. In particular, the Z strain (available from ATCC) is preferred as the HVJ strain, but other HVJ strains (for example, ATCC VR-907 and ATCC VR-105) may also be used.

Furthermore, the method of directly introducing naked-DNA is the most simple method among the methods described above, and in this regard a preferred method of introduction.

Expression vectors as used herein may be any expression vectors so long as they permit the *in vivo* expression of the gene of interest. Examples include expression vectors such as pCAGGS (Gene 108:193-200(1991)), pBK-CMV, pcDNA3.1, pZeoSV (Invitrogen, Stratagene) and the like.

B. Usage of a viral vector

Representative methods that use viral vectors include those using viral vectors such as recombinant adenovirus, retrovirus and the like. More specifically, the gene of interest can be introduced into a DNA virus such as detoxified retrovirus, adenovirus, adeno-associated virus, herpes virus, vaccinia virus, poxvirus, poliovirus, Sindbis virus, Sendai virus, SV40, human immunodeficiency virus (HIV) and the like, which is then infected to the cell to introduce the gene into the cell.

Among the above viral vectors, the efficiency of infection of adenovirus is known to be much higher than that of other viral vectors. In this regard, it is preferred to use an adenovirus vector system.

As methods of introducing a gene therapy agent into a patient, there are *in vivo* methods, which permit direct introduction of the gene therapy agent into the body, and *ex vivo* methods, in which certain cells are removed from a human, wherein the gene therapy agent is introduced and which are then returned into the body (Nikkei Science, April 1994 issue pp.20-24; Monthly Yakuji, 36(1):23-48 (1994); Supplement To Experimental Medicine 12(15) (1994); Handbook for Development and Research of Gene Therapy, NTS (1999)). According to the present invention, the *in vivo* method is preferred.

Dosage forms may take various forms according to various administration regimens described above (for example, liquids). When, for example, an injection containing the gene as the effective ingredient is to be used, said injection may be prepared by dissolving the effective ingredients into a standard solvent (a buffer such as PBS, physiological

saline, sterile water, etc.). The injection liquid may then be filter-sterilized with filter as needed, and then filled into sterilized containers. Conventional carriers and so on may be added to the injection. Liposomes, such as HVJ-liposome may take the form of suspensions, frozen formulations, centrifugation-concentrated frozen formulations and the like.

It is possible to use known factors having angiogenic functions, additionally or alone besides the HGF gene used in this invention. For example, it is reported that factors such as VEGF and FGF have an angiogenic function and therefore such genes can be used. Further, growth factors such as EGF are reported to repair cell damage in various tissues and thus genes encoding them can be also used.

The diabetic ischemic disease herein includes diseases such as diabetic lower limb ischemic disease, diabetic ischemic neuropathy and diabetic ischemic cardiac infarction and so on, and the therapeutic agent of this invention can be applied to any of these diseases. Moreover, the therapeutic agent of this invention can be applied not only to patients with critical diabetic ischemic disease but also to patients with progressively mild symptoms.

Proper methods and sites for administration adequate for the disease or symptom to be treated are selected for the gene therapy agent of this invention. As to the administration methods, parenteral administration methods are preferred. As a preferable administration site, the ischemic site can be mentioned. "Ischemic site" herein refers to the site including the affected site of ischemia and surrounding sites thereof.

Specifically, it is possible to administer into the blood vessel or into the muscle of the ischemic site. However, administration into the muscle of the ischemic site is preferred. In other words, administration into the skeletal muscle of the lower limb ischemic site enables stimulation of angiogenesis in the affected site of ischemia and improvement of bloodflow. Thereby, it enables recovery and normalization of the function of the ischemic site. While in cardiopathy,

such as cardiac infarction, it is possible to gain similar effect by administering into the cardiac muscle.

Examples of preferred administration methods include, for example, administration by noninvasive catheter, noninvasive injector and so on. Moreover, administration methods which utilize a noninvasive catheter, noninvasive injector and such under the usage of echo can be mentioned. As a method using noninvasive catheter, for example, injecting HGF genes directly into the cardiac muscle from the ventricle inner space in a cardiopathy can be indicated.

Application of the HGF gene of the present invention makes positive treatment for patients with diabetic ischemic disease possible. For example, it enables the recovery of function in patients with critical symptoms to whom no option, other than surgical excision of the affected site, is left.

Dosage of the therapeutic agent of this invention varies depending on the symptoms of the patient but HGF genes about 1 μ g to about 50 mg, preferably about 10 μ g to about 5 mg, more preferably about 50 μ g to about 5 mg per adult patients can be defined.

The therapeutic agent of this invention is suited for administration once every few days or once every few weeks, and administration once per week is preferred. According to the therapeutic treatment of the invention, genes are administered noninvasively and, therefore, desired genes can be administered as much as the condition demands.

The present invention will now be specifically explained with reference to the following examples. It should be noted, however, that the present invention is not limited by these examples in any way.

Materials and Methods

Preparation of HVJ-liposome agent

10 mg dried lipid (a 1:4.8:2 mixture of phosphatidyl serine, phosphatidyl choline and cholesterol) and 200 μ l balanced salt solution (137 μ M NaCl, 5.4 μ M KCl, 10 μ M Tris-HCl; pH7.6) containing HGF gene (100 μ g)-HMG1 (high mobility group 1 nuclear protein, 25 μ g) was mixed

and, by stirring vigorously with ultrasonication, liposomes were formed. Purified Sendai virus (Z strain) was irradiated with UV (110erg/mm²/sec) for 3 minutes. Liposome suspension was mixed with Sendai virus (HVJ), heated at 4°C for 10 minutes, and then heated at 37°C for 30 minutes.

5 Free HVJ was discarded and thus obtained HVJ liposome agent.

Experimental Animals

Administered group: ischemic rat of diabetic rat (DM-rat)

Control rat: ischemic rat of normal rat

Administration method of HVJ-liposome agent

10 By surgically excising the femoral artery of one leg of the diabetic rat (6 weeks old; 6 animals per group), to which diabetes was provoked by interperitoneal administration of streptozotocin, ischemic state in the lower limb site was produced.

HVJ-liposome preparation containing HGF gene was injected to the
15 lower limb skeletal muscle.

Details of examination

After administration of the liposome preparation, the bloodflow of the lower limb was measured by laser Doppler imager (LDI) using laser scatter analysis as the index of bypass circulation formation and effects
20 of improvement in bloodflow. The average of colored histogram of ischemic lower limb to that of the normal lower limb was taken as the perfusion ratio.

The density of blood capillary in the lower limb ischemic site was measured by alkalinephosphatase (ALP) staining, and the result of
25 diabetic lower limb ischemic rat group was compared to that of the control lower limb ischemic rat group. Alternatively, comparison between the groups to which HGF gene was administered and to which no HGF gene was administered was made.

30 Reference 1

HGF expression state in the lower limb ischemic site of the diabetic rat

Ischemic state in the lower limb site was produced by surgical

excision of the femoral artery of one leg of the diabetic rats (6 weeks old; 6 animals per group), to which diabetes was provoked by interperitoneal administration of streptozotocin, and of normal rats (6 weeks old; 6 animals per group) as the control group.

5 After one week, the perfusion ratio of the ischemic site was measured by laser Doppler imager. The perfusion ratio of the ischemic site or the diabetic lower limb ischemic rat was much lower than that of the control lower limb ischemic rat (see Figure 1).

10 The perfusion ratio of the lower limb was measured again 3 weeks and 5 weeks later, and the same results were obtained. That is, the perfusion ratio of the lower limb of the diabetic lower limb ischemic rat was much lower than that of the control lower limb rat (see Figure 1).

15 The internal HGF concentration in the muscles was significantly lower in the muscles of the ischemic site of the diabetic lower limb ischemic rat than that of the control lower limb ischemic rat. This result indicates that angiogenesis in diabetes is poor due to the decrease of internal HGF in the muscles. Therefore, angiogenesis hardly occurs in diabetic lower limb ischemic rat and bypass circulation does not develop
20 (see Figure 2).

Experiment 1

Effect of HGF gene therapy against diabetic lower limb ischemic rat (I)

25 Ischemic state in the lower limb site was produced by surgical excision of the femoral artery of one leg of the diabetic rats (6 weeks old; 6 animals per group), to which diabetes was provoked by interperitoneal administration of streptozotocin. After surgical excision of the femoral artery, infusion of HVJ-liposome preparation containing HGF gene (50 µg) was injected into the muscle of the lower
30 limb ischemic site.

After 3 weeks, the perfusion ratio of the ischemic site was measured by laser Doppler imager. The perfusion ratio of the ischemic site of the diabetic lower limb ischemic rat, to which HGF gene was administered,

showed significant increase compared to that of the control lower limb ischemic rat or that of the diabetic lower limb ischemic rat above with no administration.

5 Taking perfusion ration of the control lower limb ischemic rat as 100%, that of the HGF gene untreated diabetic lower limb ischemic rat was 67% and that of the HGF administered diabetic lower limb ischemic rat was 129%. The results are shown in Figure 3 (see Figure 1).

Experiment 2

10 Effect of HGF gene therapy against diabetic lower limb ischemic rat (II)

Diabetic lower ischemic rat and control lower limb ischemic rat treated as above were prepared and subjected to HGF gene therapy. 5 weeks later, the skeletal muscle of the lower limb ischemic site was taken from each animal, subjected to ALP staining and the blood vessel
15 count per unit area was compared. The blood vessel count of HGF gene untreated diabetic lower limb ischemic rat was significantly smaller as that of the control lower limb ischemic rat, and that of the HGF administered diabetic lower limb ischemic rat was significantly increased. The results are shown in Figure 4.

20

Reference 2

Influence of glucose concentration and HGF addition against MMP-1 production of the angioendothelial cell

The angioendothelial cells (derived from human aorta) were cultured
25 in three types of serum free medium containing glucose at a concentration of 0, 25 mM and 50 mM, respectively. After 24 hours of cultivation, the MMP-1 concentration in the supernatant of the culture media was measured.

Each sample was compared to that in which 100 ng/ml of HGF was
30 added 30 minutes before glucose addition.

The MMP-1 concentration of the supernatant decreased significantly depending on the glucose concentration, and it was shown that decrease of MMP-1 was inhibited by HGF treatment. The results are shown in Figure

5.

Reference 3

Effect of HGF against angioendothelial cells (Changes of transcription factor ETS-1 related to angiogenesis)

Cultivation of angioendothelial cell was conducted as in reference 2, and expression of mRNA of the transcription factor ETS-1 in the cell was detected. Taking the mRNA of ETS-1 in the control endothelial cell as 100 %, that of the HGF untreated angioendothelial cell decreased in a glucose dependent manner. On the other hand, HGF treated angioendothelial cells expressed the mRNA of ETS-1 at the same or more level compared to that of the control group ($P < 0.01$). The results are shown in Figure 6.

As described above, angioendothelial cells under high glucose concentration show a decrease in MMP-1 expression, which is a matrix cleaving enzyme essential for angiogenesis, and show a decrease in the expression of mRNA of the transcription factor ETS-1, which is expressed and increases during angiogenesis.

Consequently, it was revealed that angiogenesis hardly occurs under high glucose condition. On the other hand, it was shown that by adding HGF to the angioendothelial cell under high glucose condition, MMP-1 expression and mRNA of ETS-1 expression increases significantly. Thus, it was revealed that HGF makes angiogenesis easier.

Industrial Applicability

The therapeutic agent for diabetic ischemic disease containing an HGF gene as the effective ingredient improves poor angiogenesis specific to the affected site of diabetic ischemia with decrease in HGF expression and shows significant angiogenic effect. Therefore, it enables the improvement of the condition by increasing the bloodflow in the affected site of ischemia. Moreover, the therapeutic agent of this invention can be administered more than once, depending on the

symptoms of the patient, thereby stimulating angiogenesis. Therefore, according to these effects, the therapeutic agent of this invention makes it possible to treat diabetic lower limb ischemic disease, diabetic ischemic neuropathy and diabetic cardiac infarction.

CLAIMS

1. A therapeutic agent for diabetic ischemic disease, which comprises hepatocyte growth factor (HGF) as the effective ingredient.
- 5 2. The therapeutic agent according to claim 1, used for administration to the ischemic site.
3. The therapeutic agent according to claim 1 or 2, wherein the diabetic ischemic disease is selected from the group consisting of diabetic lower limb ischemic disease, diabetic ischemic neuropathy or diabetic ischemic myocardial infarction.
- 10 4. The therapeutic agent according to claim 3, wherein the diabetic ischemic disease is diabetic lower limb ischemic disease.
5. The therapeutic agent according to any of claims 1 to 4, used for administration into the muscle of the ischemic site.
- 15 6. The therapeutic agent according to any of claims 1 to 5, wherein the HGF gene is in the form of a Sendai virus (HVJ)-liposome.
7. The therapeutic agent according to any of claims 1 to 6, which is to be administered repeatedly as needed.
8. The therapeutic agent according to any of claims 1 to 7, wherein the amount of HGF gene used is at least 50 μ g.
- 20 9. A method for the treatment of diabetic ischemic disease, which comprises the transfer of the HGF gene into human.
10. The method according to claim 9, wherein the HGF gene is administered to an ischemic site.
- 25 11. The method according to claim 9 or 10, wherein the diabetic ischemic disease is selected from the group consisting of diabetic lower limb ischemic disease, diabetic ischemic neuropathy or diabetic ischemic myocardial infarction.
12. The method according to claim 11, wherein the diabetic ischemic disease is diabetic lower limb ischemic disease.
- 30 13. The method according to any of claims 9 to 12, wherein the HGF gene is administered into the muscle of ischemic site.
14. The method according to any of claims 9 to 13, wherein the HGF gene

is in the form of a Sendai virus (HVJ)-liposome.

15. The method according to any of claims 9 to 14, wherein the HGF gene is administered repeatedly as needed.

5 16. The method according to any of claims 9 to 15, wherein the amount of HGF gene to be administered is at least 50 µg.

17. Use of the HGF gene for preparing therapeutic agents for diabetic ischemic disease.

10 18. The use according to claim 17, wherein the diabetic ischemic disease is selected from the group consisting of diabetic lower limb ischemic disease, diabetic ischemic neuropathy or diabetic ischemic myocardial infarction.

19. The use according to claim 18, wherein the diabetic ischemic disease is diabetic lower limb ischemic disease.

15 20. The use according to any of claims 17 to 19, wherein the HGF gene is in the form of a Sendai virus (HVJ)-liposome.

21. The use according to any of claims 17 to 20, wherein the amount of HGF gene to be used is at least 50 µg.

ABSTRACT

It is possible to stimulate the angiogenesis of an ischemic site declined by diabetes and to recuperate ischemic disease by administering
5 HGF (hepatocyte growth factor) gene to the diabetic ischemic site.